บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 เพื่อนำเซลล์ที่มีการสะสม PHB มาใช้ผลิตโมโนเมอร์ R3HB โดยปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์

4.1.1 การผลิต PHB โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ติดตามการเติบโตของเชื้อทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยหาความหนาแน่นของเซลล์ และคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ผลการวิจัยแสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 16 พบว่ากล้าเชื้ออายุ 6 ชั่วโมงให้อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.9 ต่อชั่วโมง ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับรายงานผลการวิจัยของอติพล บุญเรืองถาวร (2543) ดังนั้นจึงเลือกกล้าเชื้ออายุ 6 ชั่วโมงไปใช้ในการวิจัยต่อไป

Oeding และ Schlegel (1973) พบว่าการที่อะซิติลโคเอจะถูกออกซิไดซ์ผ่านวัฏจักร TCA หรือเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHB ขึ้นอยู่กับภาวะแวดล้อมของการเลี้ยงเชื้อ จากรายงานการวิจัยของ Doi และคณะ (1995) พบว่าวิถีการสังเคราะห์ PHA ขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารตั้งต้น เช่น การสังเคราะห์ PHB จะใช้กรดบิวไทริก ซึ่งมีจำนวนคาร์บอน 4 อะตอมเป็นสารตั้งต้น การสังเคราะห์ PHV จะใช้กรดวาเลอริก ที่มีจำนวนคาร์บอน 5 อะตอมเป็นสารตั้งต้น เป็นต้น การเลือกใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB จะแตกต่างกันขึ้นกับความสามารถของจุลินทรีย์แต่ละชนิด สารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์โมโนเมอร์ 3HB มีหลายชนิด ได้แก่ กรดบิวไทริก และน้ำตาลชนิดต่างๆ พบว่าเมื่อใช้กรดบิวไทริกเป็นสารตั้งต้นได้ปริมาณ PHB น้อยกว่าการใช้ซูโครสเป็นสารตั้งต้น รวมทั้งกรดบิวไทริกเป็นสารตั้งต้นที่มีราคาแพงกว่าซูโครสมาก

รัตนศิริ มุทิตากุล (2538) ได้คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB จากดิน คัดเลือกได้สายพันธุ์ *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งสามารถผลิต PHB ได้ปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์อื่น เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถใช้ซูโครส และกากน้ำตาลได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลชนิดอื่น ได้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 47 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ต้องนำเซลล์ที่มีการผลิต PHB สูงสุดไปใช้ในปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันต่อไป หากเลือกใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนอาจมีสิ่งปนเปื้อนปริมาณมาก ซึ่งส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณโมโนเมอร์ R3HB ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกน้ำตาลทราย ซึ่งมีซูโครสเป็นองค์ประกอบหลัก ประมาณ 94 เปอร์เซ็นต์

(สุดา สุภาชวินสวัสดิ์, 2542) และมีราคาถูกกว่าซูโครสเกรดวิเคราะห์มากสำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB

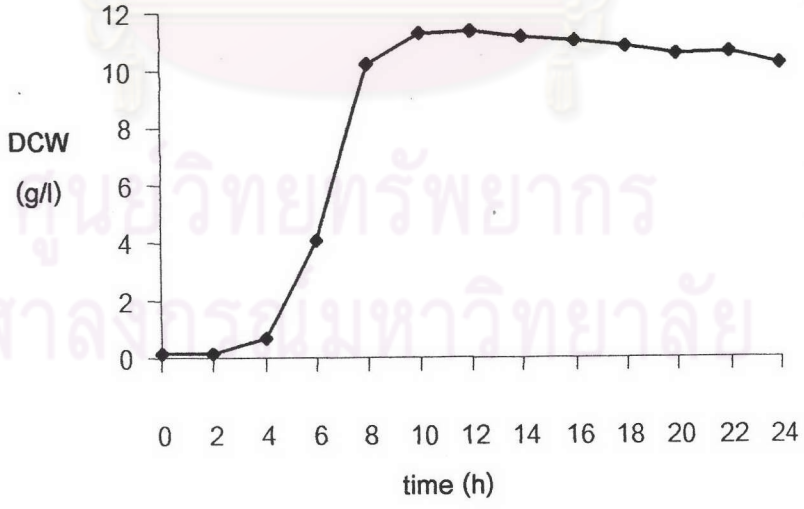
นอกจากนี้ในรายงานการศึกษาของ รัตนศิริ มุทิตากุล (2538) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิต PHB เปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนระหว่างอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆ กับอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ เกลือแอมโมเนียมหลายชนิด พบว่าการใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตทำให้ *Bacillus* sp. BA-019 สามารถสังเคราะห์และสะสม PHB ได้ดีกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 31.73 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ต่อมามีรายงานการศึกษาของ สุดา สุภาชวินสวัสดิ์ (2542) ศึกษาการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ สารสกัดจากยีสต์ และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV จากเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 พบว่าเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนมีผลทำให้ *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิต PHBV ได้สูงกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอื่นๆ อติพล บุญเรืองถาวร (2543) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิต PHB พบว่าเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้เชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 มีการเติบโตและสามารถผลิต PHB ได้สูงกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิต PHB

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการผลิต PHB ของ *Bacillus* sp.BA-019 ตามวิธีข้อ 3.5.1 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 12, 18, 24 และ 30 นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ ผลการวิจัยแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 17 พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.67 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 18 โดยความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 2.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 44.40 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลือเท่ากับ 13.67 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 30 ส่วนยูเรียถูกใช้หมดไปตั้งแต่ชั่วโมงที่ 18 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการสร้าง และสะสม PHB สูงสุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 การเจริญของ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ

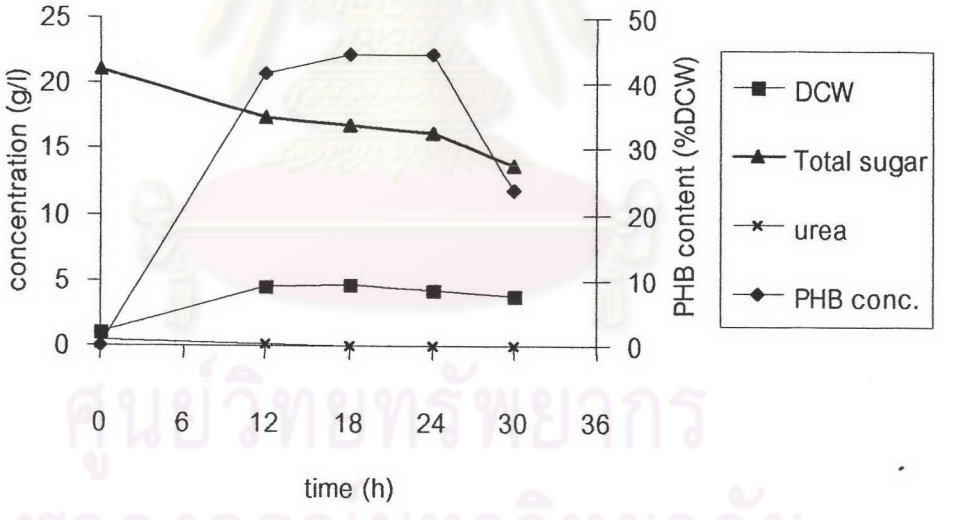
time (h)	DCW (g/l)	μ (h^{-1})
0	0.11	-
2	0.14	0.12
4	0.68	0.79
6	4.09	**0.90**
8	10.2	0.46
10	11.24	0.05
12	**11.34**	0.004
14	11.14	-0.01
16	11.03	-0.01
18	10.83	-0.01
20	10.55	-0.01
22	10.57	0.001
24	10.2	-0.02



รูปที่ 16 การเจริญของ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ

ตารางที่ 5 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ PHB และปริมาณ PHB ของเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019

time (h)	DCW (g/l)	total sugar (g/l)	urea (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
0	1.08	21	0.44	0	0
12	4.46	17.41	0.08	1.85	41.38
18	**4.67**	**16.78**	**0.05**	**2.07**	**44.40**
24	4.21	16.21	0	1.87	44.31
30	3.73	13.67	0	0.88	23.57



รูปที่ 17 การผลิต PHB โดยเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.2 ผลของปริมาณสารละลาย trace element ต่อการผลิต PHB

จุลินทรีย์แต่ละชนิดที่สามารถสร้างและสะสม PHB ภายในเซลล์มีความต้องการชนิดและปริมาณของแร่ธาตุเพื่อการเติบโต และการผลิตพอลิเมอร์ต่างกัน Son และคณะ (1996) ศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) จากเชื้อ *Pseudomonas* sp. EL-2 พบว่าความเข้มข้นของแร่ธาตุมีผลต่อการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) และการสังเคราะห์โมโนเมอร์ 3HV จากรายงานของ Park และคณะ (1997) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus theringiensis* R-510 ในระดับขวดเขย่าเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย trace element มีผลทำให้ปริมาณโคพอลิเมอร์ และสัดส่วนโดยโมลสูงขึ้น แต่มีผลต่อการเติบโตเพียงเล็กน้อย

รัตนศิริ มุทิตากุล (2538) ศึกษาสูตรของสารละลาย trace element ต่อความสามารถในการเติบโตและการผลิต PHB ของเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 พบว่าแร่ธาตุในสารละลาย trace element มีผลต่อการผลิต PHB อติพล บุญเรืองถาวร (2543) รายงานผลของชนิดและปริมาณของแร่ธาตุในสารละลาย trace element พบว่าสารละลาย trace element สูตรที่ 2 ซึ่งปรับปรุงมาจาก รัตนศิริ มุทิตากุล (2538) ทำให้ *Bacillus* sp. BA-019 มีการเติบโต และผลิต PHB ได้สูงขึ้น จากรายงานของกิตติพงศ์ ปวรางกูร (2545) ศึกษาผลของปริมาณสารละลาย trace element สูตรที่ 2 ปริมาตร 2 และ 3 มิลลิลิตร/ลิตร เปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่เติมสารละลาย trace element ปริมาตร 1 มิลลิลิตร/ลิตร ต่อการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) แบบเฟชแบดของเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 พบว่าปริมาณสารละลาย trace element เท่ากับ 2 และ 3 มิลลิลิตร/ลิตร มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่ได้น้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่าการใช้ปริมาณ trace element 1 มิลลิลิตร/ลิตร และมีผลต่อปริมาณโมโนเมอร์ 3HB ในโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) คือปริมาณสารละลาย trace element 2 มิลลิลิตร/ลิตร ให้ผลผลิตโมโนเมอร์ 3HB สูงกว่าการเติมปริมาณสารละลาย trace element 1 และ 3 มิลลิลิตร/ลิตร

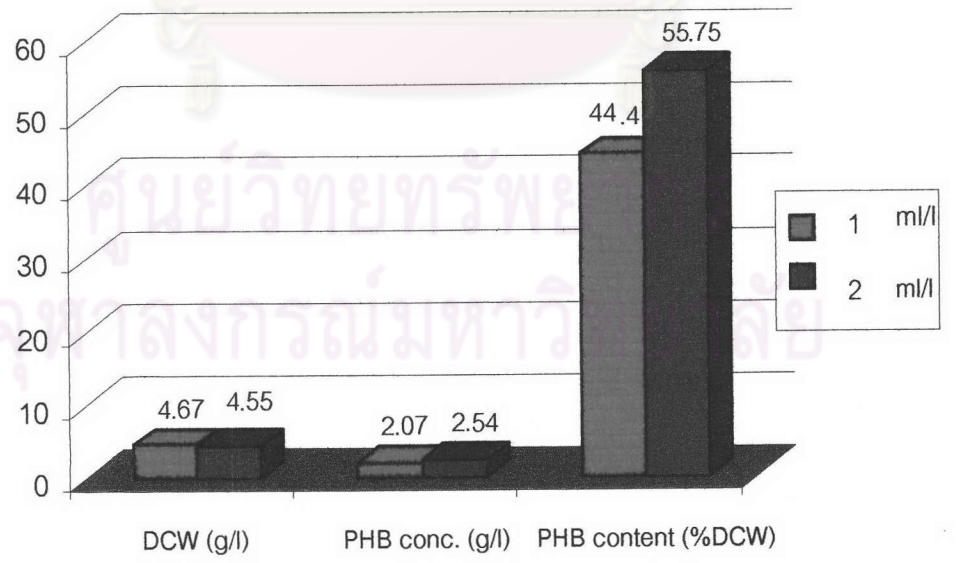
ในงานวิจัยนี้ได้ที่ผ่านมาใช้สารละลาย trace element 1 มิลลิลิตรต่อลิตร ดังนั้นจึงศึกษาการเพิ่มปริมาณ trace element สูตรที่ 2 เพื่อให้เชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 มีการเติบโต และการสังเคราะห์ PHB ที่สูงขึ้น ตามวิธีข้อ 3.5.2 โดยใช้สารละลาย trace element สูตรที่ 2 ปริมาตร 1 และ 2 มิลลิลิตรต่อลิตร ผลการวิจัยแสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 18 พบว่าเมื่อใช้สารละลาย trace element สูตรที่ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อลิตร เชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 มีการผลิต PHB ได้สูงกว่าการใช้สารละลาย trace element ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อลิตร คือเชื้อผลิต PHB สูงสุดชั่วโมงที่ 18 ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 2.54 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 55.75 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ขณะที่การใช้ trace element ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อลิตร ความ

เข้มข้นของ PHB เท่ากับ 2.07 กรัม/ลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB 44.40 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง การเพิ่มปริมาณ trace element มีผลทำให้การผลิต PHB สูงขึ้น ดังนั้นจึงเพิ่มปริมาณสารละลาย trace element เท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อลิตร ในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ให้ได้ปริมาณ PHB มาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ PHB และปริมาณ PHB เมื่อใช้สารละลาย trace element สูตรที่ 2 ปริมาตร 1 และ 2 มิลลิลิตรต่อลิตร

Trace element สูตรที่ 2	time (h)	DCW (g/l)	total sugar (g/l)	urea (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (%DCW)
1 ml/l	0	1.08	21	0.44	0	0
	12	4.46	17.41	0.08	1.85	41.38
	18	**4.67**	**16.78**	**0.05**	**2.07**	**44.40**
	24	4.21	16.21	0	1.87	44.31
	30	3.73	13.67	0	0.88	23.57
2 ml/l	0	1.78	19.8	0.47	0	0
	12	4.37	18.04	0.07	2.34	53.49
	18	**4.55**	**16.46**	**0.04**	**2.54**	**55.75**
	24	6.69	15.45	0.02	3.34	49.88
	30	6.11	13.43	0	2.90	47.48



รูปที่ 18 เปรียบเทียบการผลิต PHB เมื่อใช้ปริมาณ trace element สูตรที่ 2 ปริมาตร 1 และ 2 มิลลิลิตร/ลิตร

4.2 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ในการผลิตโมโนเมอร์ R3HB

Muller และ Seebach (1993) ศึกษาปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ที่สะสม PHB พบว่ามีระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ ระบบเอนไซม์ intracellular PHB depolymerase ประกอบด้วยเอนไซม์ PHB depolymerase กับ dimer hydrolase ซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยสายพอลิเมอร์ PHB ภายในเซลล์ให้เป็นโมโนเมอร์ R3HB ดังแสดงในรูปที่ 3 ในการตรวจหาปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ วัดจากปริมาณผลผลิตโมโนเมอร์ R3HB ที่เกิดขึ้น ถ้าโมโนเมอร์ R3HB มีปริมาณมาก แสดงว่า ปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันเกิดได้ดี งานวิจัยนี้ไม่ได้วัดจากกิจกรรมของเอนไซม์ intracellular PHB depolymerase โดยตรง แต่เป็นการศึกษาปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นจึงต้องหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว Lee และคณะ (1999) รายงานผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ของ *Alcaligenes latus* DSM 1123 พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 โดยภาวะที่ไม่มีการเขย่า (static condition) *Alcaligenes latus* DSM 1123 สามารถผลิตโมโนเมอร์ R3HB ได้ (11.3 กรัมต่อลิตร) สูงกว่าเมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส

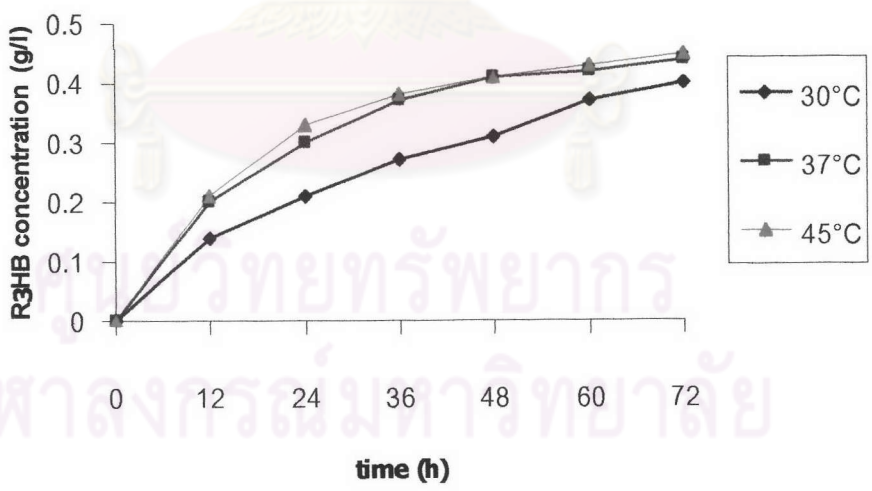
ในงานวิจัยนี้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน ตามวิธีข้อ 3.6 เมื่อนำเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ที่มีการผลิต PHB สูงที่สุด มากระจายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 บ่มสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส โดยภาวะที่ไม่มีการเขย่า เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการวิจัยแสดงในตารางที่ 7 และรูปที่ 19 พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิตโมโนเมอร์ R3HB ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งทั้ง 2 อุณหภูมิมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (ตารางที่ 17, ภาคผนวก จ) กล่าวคือมีปริมาณโมโนเมอร์ R3HB เท่ากับ $0.36 \pm 9.47 \times 10^{-2}$ และ $0.37 \pm 9.94 \times 10^{-2}$ กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณโมโนเมอร์ R3HB เท่ากับ 13.95 และ 14.34 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณ PHB เริ่มต้นตามลำดับ เพื่อความสะดวกในการทำวิจัย และเป็นการประหยัดพลังงานจึงเลือกที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ศึกษาปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันของ *Bacillus* sp. BA-019 ต่อไป จากรูปที่ 20 แสดง HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานภายใน (internal standard) มี retention time ประมาณ 10 นาที และสารมาตรฐานโมโนเมอร์ R3HB มี retention time เท่ากับ 16.3 นาที (รูปที่ 20A) ส่วนในรูปที่ 20B คือ HPLC โครมาโตแกรมของตัวอย่างสารผสมปฏิกิริยาที่บ่มที่อุณหภูมิต่างกัน พบว่าในสารผสมปฏิกิริยาพบ peak ที่มี retention time ที่เวลา 16.3 นาที

ซึ่งเป็น peak ของโมโนเมอร์ R3HB และมี peak ที่มี retention time ประมาณ 7 นาที คาดว่าน่าจะเป็นเมตาโบไลซ์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน นอกจากนี้มี peak ที่ retention time ประมาณ 19.5 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับ HPLC โครมาโตแกรมของอะซิเตต พบว่ามี retention time ใกล้เคียงกัน ดังนั้นอาจจะสรุปได้ว่า peak ดังกล่าวเป็นอะซิเตต และเมื่อพิจารณาจากรูปที่ 21 แสดง HPLC โครมาโตรแกรมของการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ที่เกิดจากปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า peak ที่มี retention time เท่ากับ 16.4 นาที เป็น peak ของโมโนเมอร์ R3HB ส่วน peak ที่มี retention time ประมาณ 19 นาที เป็น peak ของอะซิเตต ซึ่งมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามลำดับเช่นเดียวกัน Gao และคณะ (2002) รายงานว่าอะซิเตตเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by product) ของการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ซึ่งสามารถเปลี่ยนจากอะซิติลโคเอไปเป็นอะซิเตต เมื่อพิจารณาจากวิถีเมตาบอลิซึมภายในเซลล์มีความเป็นไปได้ว่า อะซิเตตเป็นสารที่พบได้ในเซลล์ ซึ่งอาจเกิดจากการคะตะไลซ์ปฏิกิริยาการเปลี่ยนโมโนเมอร์ R3HB ไปเป็นอะซิเตต หรืออาจเกิดจากการเปลี่ยนกรดอะมิโน และกรดไขมันภายในเซลล์ไปเป็นอะซิเตต ซึ่งอะซิเตตเป็นสารที่มีความจำเป็นในการสังเคราะห์สารอื่น เพื่อการมีชีวิตของเซลล์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

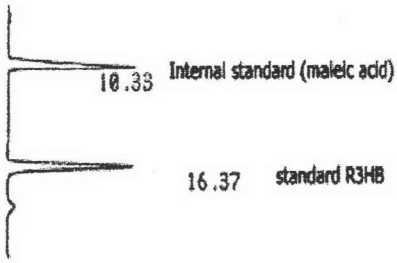
ตารางที่ 7 ผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันของ *Bacillus* sp. BA-019 ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0

time (h)	R3HB concentration (g/l)		
	30 °C	37 °C	45 °C
0	0	0	0
12	0.14	0.20	0.21
24	0.21	0.30	0.33
36	0.27	0.37	0.38
48	0.31	0.41	0.41
60	0.37	0.42	0.43
72	0.40	0.44	0.45

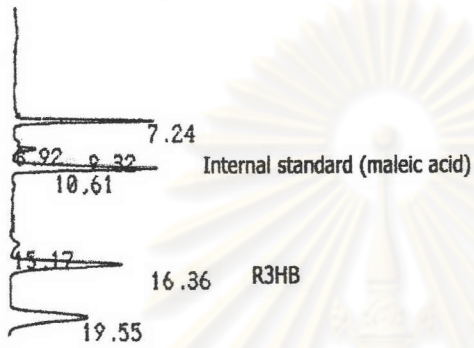


รูปที่ 19 ผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันของ *Bacillus* sp. BA-019 ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0

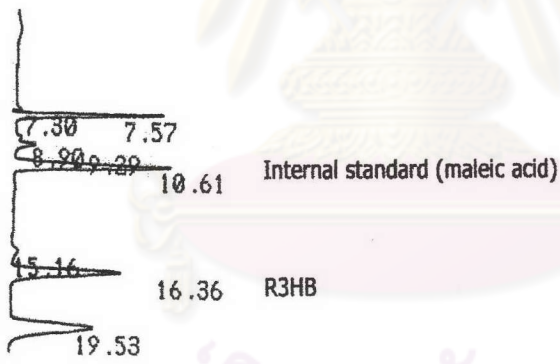
A.



B.



C.



รูปที่ 20 HPLC โครมาโตแกรมผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน ในการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

A. สารมาตรฐานโมโนเมอร์ R3HB

B. ตัวอย่างสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

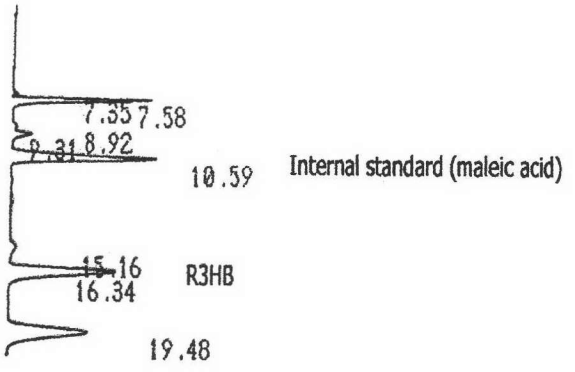
C. ตัวอย่างสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

D. ตัวอย่างสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

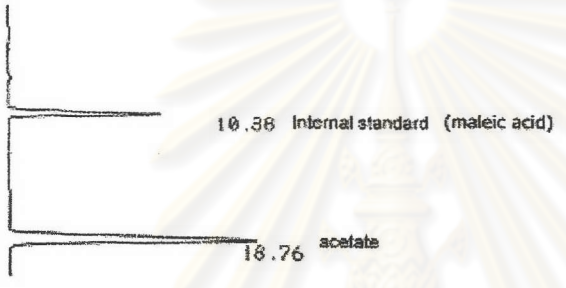
E. อะซิเตตบัฟเฟอร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

D.



E.

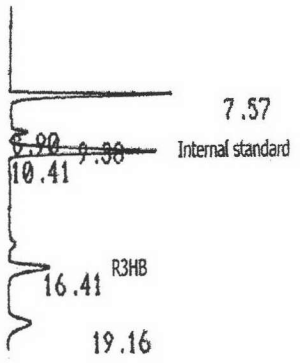


รูปที่ 20 (ต่อ) HPLC โครมาโตแกรมผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน ในการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

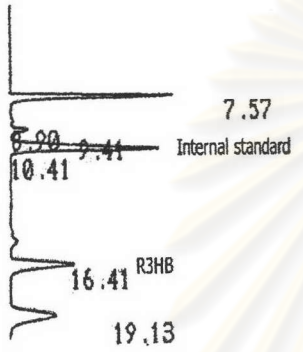
A. สารมาตรฐานโมโนเมอร์ R3HB
B. ตัวอย่างสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
C. ตัวอย่างสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
D. ตัวอย่างสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส
E. อะซิเตตบัฟเฟอร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

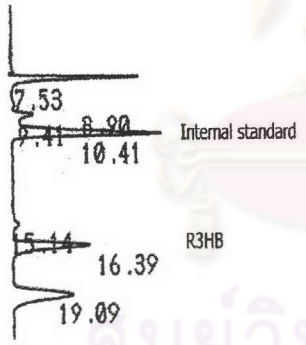
A.



B.



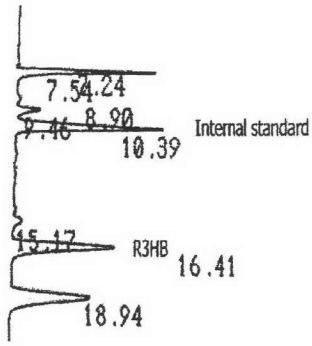
C.



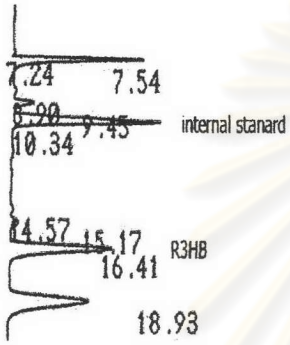
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 21 HPLC โครมาโตแกรมการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ที่เกิดจากปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง A.) ชั่วโมงที่ 12, B.) ชั่วโมงที่ 24, C.) ชั่วโมงที่ 36, D.) ชั่วโมงที่ 48, E.) ชั่วโมงที่ 60, F.) ชั่วโมงที่ 72

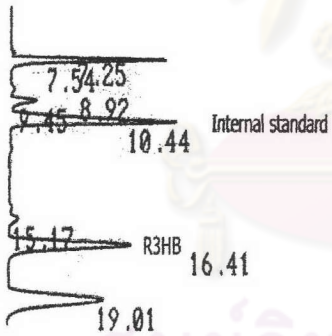
D.



E.



F.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 21 (ต่อ) HPLC โครมาโตแกรมการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ที่เกิดจากปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง A.) ชั่วโมงที่ 12, B.) ชั่วโมงที่ 24, C.) ชั่วโมงที่ 36, D.) ชั่วโมงที่ 48, E.) ชั่วโมงที่ 60, F.) ชั่วโมงที่ 72

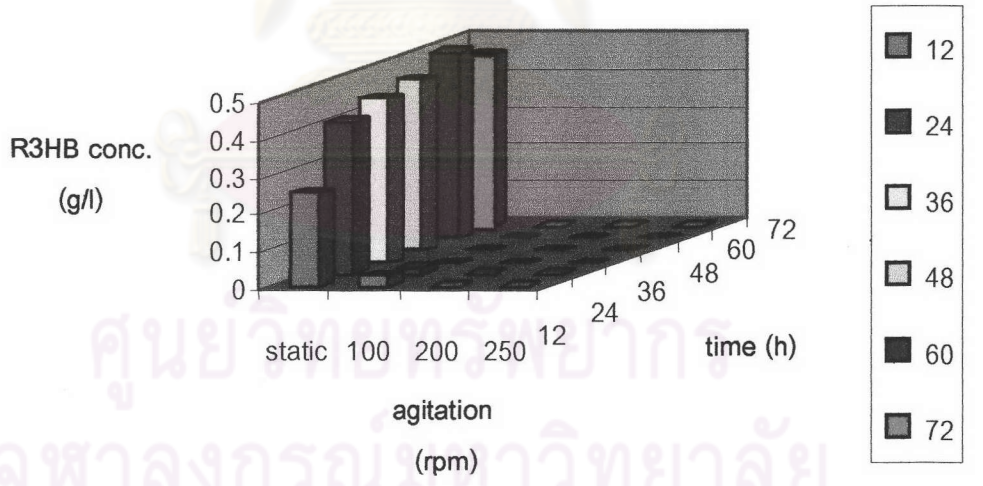
4.3 ศึกษาผลของการเขย่าที่มีต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ในการผลิตโมโนเมอร์ R3HB

จากผลการวิจัยก่อนหน้านี้ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันในภาวะการบ่มสารผสมปฏิกิริยาที่ไม่มีการเขย่า Lee และคณะ (1999) รายงานว่าในการผลิตโมโนเมอร์ R3HB โดยการหาภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ PHB depolymerase ภายในเซลล์ของ *Alcaligenes latus* DSM 1123 ในภาวะที่มีการจำกัดสารอาหาร เซลล์ที่สะสม PHB จะย่อยสลาย PHB ไปเป็นโมโนเมอร์ R3HB และเปลี่ยนโมโนเมอร์ R3HB เป็นอะซิโตอะซิเตต (acetoacetate) กลับเข้าสู่วัฏจักร TCA เพื่อเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ ถ้าภาวะที่บ่มสารผสมปฏิกิริยามีออกซิเจนก็จะส่งเสริมระบบหายใจของเซลล์ เกิดการเปลี่ยนแปลงโมโนเมอร์ R3HB ไปเป็นอะซิโตอะซิเตต กลับสู่วัฏจักร TCA ทำให้ผลผลิตโมโนเมอร์ R3HB ที่ได้ลดลง ดังนั้นเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมของเซลล์ดังกล่าว จึงไม่มีการเขย่าขณะทำปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน

ในงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาผลของการเขย่าที่มีต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน ตามวิธีข้อ 3.7 เมื่อนำเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ที่มีการสะสม PHB สูงที่สุดมากระจายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งได้จากผลการศึกษาข้อ 4.2, pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 100, 200, 250 รอบต่อนาที และไม่เขย่า เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบปริมาณโมโนเมอร์ R3HB ที่ได้ ผลการวิจัยแสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 22 พบว่าภาวะที่ไม่มีการเขย่า *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตโมโนเมอร์ R3HB มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.4-0.5 กรัมต่อลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24-ชั่วโมงที่ 72 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 16-17 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณ PHB เริ่มต้น แต่เมื่อมีการเขย่าที่ 100, 200 และ 250 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ไม่สามารถผลิตโมโนเมอร์ R3HB ได้ รูปที่ 23 แสดง HPLC โครมาโตรแกรมของสารผสมปฏิกิริยาเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ภาวะที่ไม่มีการเขย่า (รูปที่ 23A) จะพบ peak ที่มี retention time 16.4 นาที ซึ่งเป็น peak ของโมโนเมอร์ R3HB แต่ในภาวะที่มีการเขย่าที่ความเร็ว 100, 200 และ 250 รอบต่อนาที แสดงในรูปที่ 23B, 23C และ 23D ตามลำดับ ซึ่งไม่พบโมโนเมอร์ R3HB

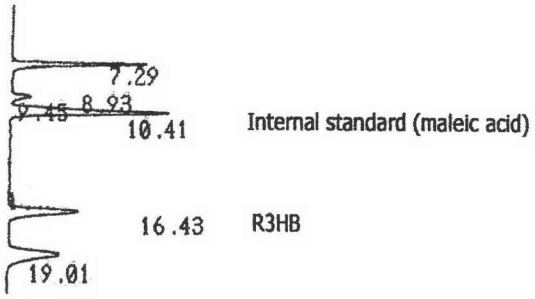
ตารางที่ 8 ผลของการเขย่าต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน เมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของโมโนเมอร์ R3HB (g/l)			
	static	100 rpm	200 rpm	250 rpm
0	0	0	0	0
12	**0.25**	0	0	0
24	**0.41**	0	0	0
36	**0.44**	0	0	0
48	**0.46**	0	0	0
60	**0.50**	0	0	0
72	**0.46**	0	0	0

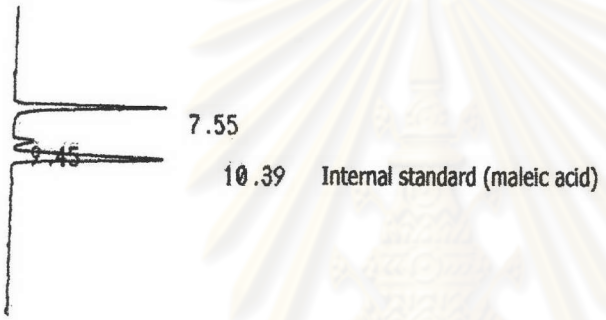


รูปที่ 22 ผลของการเขย่าต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้น 7.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

A.



B.



รูปที่ 23 HPLC โครมาโตแกรมสารผสมปฏิกิริยา เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ภาวะที่มีการเขย่า และไม่มีการเขย่า เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

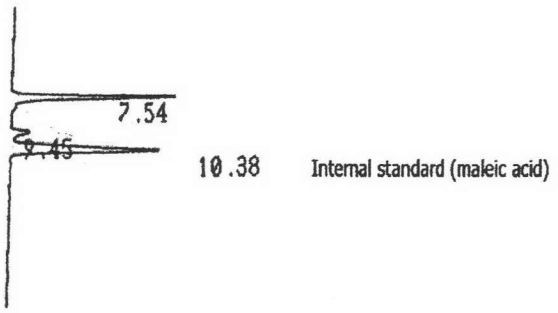
A. ตัวอย่างสารผสมปฏิกิริยาภาวะที่ไม่มีการเขย่า

B. ตัวอย่างสารผสมปฏิกิริยาเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที

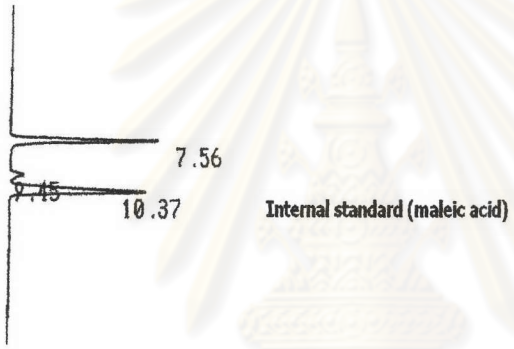
C. ตัวอย่างสารผสมปฏิกิริยาเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที

D. ตัวอย่างสารผสมปฏิกิริยาเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที

C.



D.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 23 (ต่อ) HPLC โครมาโตแกรมสารผสมปฏิกิริยา เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ภาวะที่มีการเขย่า และไม่มีการเขย่า เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

A. ตัวอย่างสารผสมปฏิกิริยาภาวะที่ไม่มีการเขย่า

B. ตัวอย่างสารผสมปฏิกิริยาเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที

C. ตัวอย่างสารผสมปฏิกิริยาเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที

D. ตัวอย่างสารผสมปฏิกิริยาเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที

4.4 ศึกษาผลของค่า pH ที่มีต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ในการผลิตโมโนเมอร์ R3HB

นอกจากอุณหภูมิและการเขย่าที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ PHB depolymerase แล้ว ค่า pH ขณะทำปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันก็มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เช่นกัน Lee และคณะ (1999) ศึกษาผลของค่า pH เริ่มต้นต่อการผลิตโมโนเมอร์ R3HB โดยปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ของ *Alcaligenes latus* DSM 1123 พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 *Alcaligenes latus* DSM 1123 สามารถผลิตโมโนเมอร์ R3HB ได้สูงสุด 96 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณ PHB เริ่มต้น ใช้เวลานาน 30 นาที

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของค่า pH ที่มีต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน ตามวิธีข้อ 3.8 โดยทำการศึกษาผลของ pH เริ่มต้นที่ไม่ได้ควบคุม และผลของ pH ที่ควบคุมให้คงที่ตลอดปฏิกิริยาด้วยบัฟเฟอร์

การศึกษาผลของค่า pH เริ่มต้นต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน ทำโดยแปรค่า pH เริ่มต้นในช่วงเท่ากับ 2.0-10.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะที่ไม่มีการเขย่า เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการวิจัยแสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 24 พบว่าปริมาณโมโนเมอร์ R3HB ที่ผลิตได้ใกล้เคียงกันในชุดการทดลองที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 3.0-10.0 แต่ในชุดการทดลองที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 2.0 ไม่พบมีการผลิตโมโนเมอร์ R3HB พบว่าเมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยานานขึ้นค่า pH ของสารผสมปฏิกิริยาลดลงมาใกล้เคียงกันประมาณ 4.0-5.0 ความเข้มข้นของโมโนเมอร์ R3HB ประมาณ 0.3-0.4 กรัมต่อลิตร โดยเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตามเวลาการบ่มสารผสไปฏิกิริยาตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และค่อนข้างคงที่ตั้งแต่เวลาประมาณ 36 ชั่วโมงเป็นต้นไป สำหรับที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 2.0 วิเคราะห์ไม่พบโมโนเมอร์ R3HB แต่เมื่อควบคุมค่า pH ของสารผสมปฏิกิริยาด้วยบัฟเฟอร์ตลอดการทดลองในช่วงเท่ากับ 4.0-9.0 ผลการวิจัยแสดงในตารางที่ 10 และรูปที่ 25 พบว่าโมโนเมอร์ R3HB ที่ผลิตได้มีปริมาณแตกต่างกันคือ เมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยาที่ pH เท่ากับ 5.5 ค่า pH ดังกล่าวอาจเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เชื้อสามารถผลิตโมโนเมอร์ R3HB ได้สูงที่สุด ความเข้มข้นของโมโนเมอร์ R3HB เท่ากับ $1.62 \pm 5.11 \times 10^{-2}$ กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 18, ภาคผนวก จ) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 94.74 เปอร์เซ็นต์ ต่อปริมาณ PHB เริ่มต้น ที่ pH เท่ากับ 4.0 ไม่พบโมโนเมอร์ R3HB จึงเลือกควบคุมค่า pH เท่ากับ 5.5 ในการศึกษาทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 9 ผลของค่า pH เริ่มต้นในช่วงเท่ากับ 2.0 – 10.0 และไม่ได้ควบคุมต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันเพื่อการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ภายในเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019

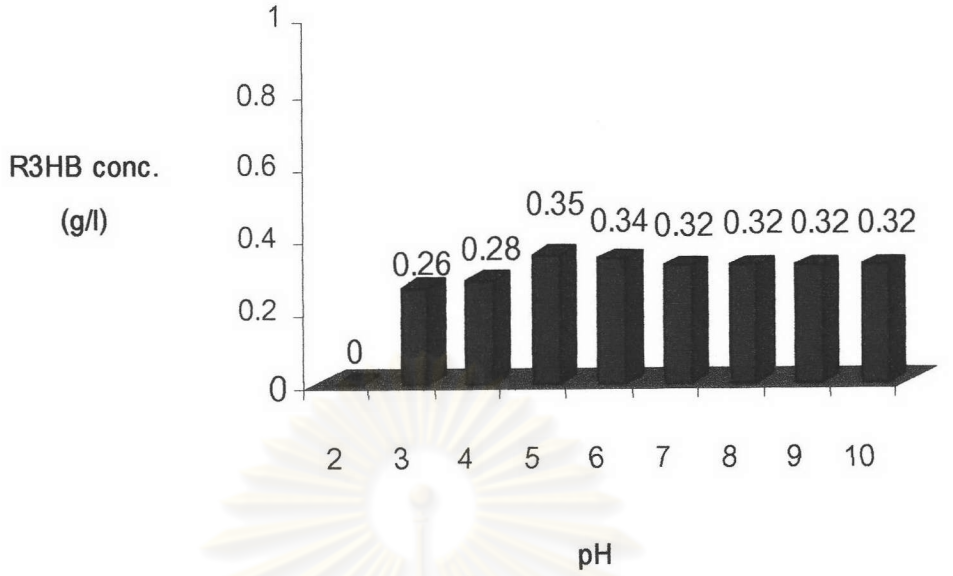
เวลา (ชั่วโมง)	pH เริ่มต้น																	
	2.0		3.0		4.0		5.0		6.0		7.0		8.0		9.0		10.0	
	R3HB	pH	R3HB	pH	R3HB	pH	R3HB	pH	R3HB	pH	R3HB	pH	R3HB	pH	R3HB	pH	R3HB	pH
0	0	2.00	0	3.10	0	4.05	0	4.95	0	5.98	0	7.06	0	7.86	0	8.93	0	9.76
12	0	3.15	0.12	4.33	0.17	4.54	0.19	4.61	0.20	4.61	0.20	4.64	0.19	4.64	0.17	4.78	0.18	4.76
24	0	2.10	0.22	4.06	0.24	4.27	0.34	4.47	0.30	4.40	0.30	4.43	0.27	4.45	0.27	4.42	0.28	4.44
36	0	2.07	0.28	3.96	0.32	4.21	0.37	4.25	0.36	4.17	0.37	4.36	0.33	4.27	0.34	4.35	0.33	4.34
48	0	2.11	0.29	3.94	0.33	4.20	0.38	4.32	0.39	4.32	0.41	4.29	0.36	4.32	0.34	4.30	0.35	4.31
60	0	2.07	0.33	3.94	0.28	4.18	0.41	4.24	0.42	4.22	0.42	4.21	0.38	4.28	0.37	4.16	0.36	4.21
72	0	2.09	0.31	3.91	0.35	4.16	0.41	4.09	0.36	4.11	0.44	4.11	0.41	4.15	0.42	4.16	0.41	4.19

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

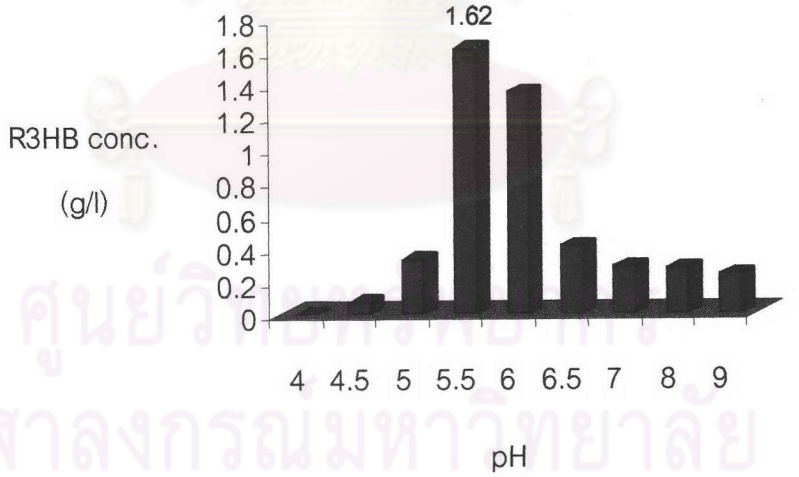
ตารางที่ 10 ผลของค่า pH ที่ควบคุมด้วยบัฟเฟอร์ ในช่วงเท่ากับ 4.0-9.0 ต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันเพื่อการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ภายในเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019

เวลา (ชั่วโมง)	pH																	
	4.0		4.5		5.0		5.5		6.0		6.5		7.0		8.0		9.0	
	R3HB	pH	R3HB	pH	R3HB	pH	R3HB	pH	R3HB	pH	R3HB	pH	R3HB	pH	R3HB	pH	R3HB	pH
0	0	4.00	0	4.49	0	5.00	0	5.48	0	5.92	0	6.42	0	6.98	0	8.08	0	9.02
12	0	4.00	0.05	4.48	0.20	5.00	1.60	5.44	0.45	5.88	0.09	6.44	0.15	6.97	0.16	8.10	0.11	9.04
24	0	4.04	0.06	4.47	0.29	5.03	1.67	5.42	1.01	5.81	0.17	6.36	0.33	6.96	0.20	8.07	0.17	8.97
36	0	4.04	0.07	4.47	0.35	5.02	1.65	5.47	1.55	5.75	0.36	6.49	0.30	6.92	0.23	8.03	0.16	8.93
48	0	4.01	0.07	4.44	0.37	5.02	1.69	5.44	1.71	5.79	0.45	6.43	0.32	6.94	0.27	8.04	0.26	8.95
60	0	4.06	0.07	4.43	0.37	5.03	1.54	5.43	1.74	5.81	0.64	6.45	0.32	6.93	0.33	8.06	0.35	9.00
72	0	4.06	0.07	4.43	0.43	5.03	1.60	5.42	1.66	5.76	0.73	6.43	0.33	6.95	0.40	8.01	0.40	8.94

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24 ผลของค่า pH เริ่มต้นต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน เมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้นเท่ากับ 2.0-10.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



รูปที่ 25 ผลของค่า pH ซึ่งควบคุมให้คงที่ด้วยบัฟเฟอร์ต่อปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน เมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH เท่ากับ 4.0-9.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

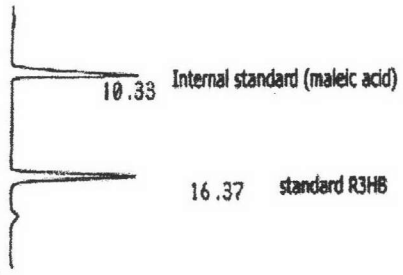
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 การตรวจหาปริมาณโมโนเมอร์ R3HB ภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ภายหลังปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน

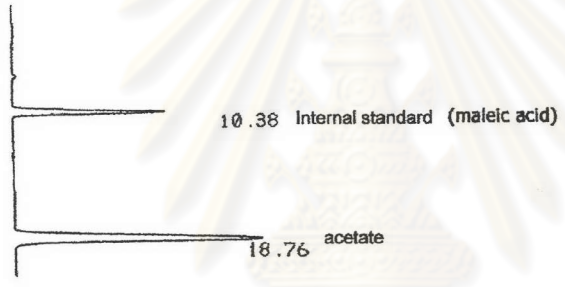
หลังการเกิดปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์แล้ว โมโนเมอร์ R3HB จะถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์อยู่ในสารผสมปฏิกิริยา (Lee และคณะ, 2003) ซึ่งได้วิเคราะห์ปริมาณโมโนเมอร์ R3HB ดังวิธีที่กล่าวไว้แล้วข้างต้น เพื่อเป็นการตรวจหาว่า ภายในเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019 ยังมีโมโนเมอร์ R3HB เหลืออยู่ในเซลล์หรือไม่ จึงได้ทำการศึกษาตามวิธีข้อ 3.9 กล่าวคือ นำเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ภายหลังทำปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, ควบคุมค่า pH เท่ากับ 4.0 และ 5.5 ซึ่งเป็นค่า pH ที่พบว่า ไม่มีการผลิตโมโนเมอร์ R3HB และที่ pH ซึ่งเซลล์ผลิตโมโนเมอร์ R3HB ได้ปริมาณสูงสุด ตามลำดับ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาปริมาณโมโนเมอร์ R3HB ผลการวิจัยแสดงในรูปที่ 26 แสดง HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานโมโนเมอร์ R3HB (รูปที่ 26A) ส่วนของเหลวภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 หลังจากปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันทั้งที่ pH 4.0 และ 5.5 (รูปที่ 26C และ 26D) ไม่พบโมโนเมอร์ R3HB เหลืออยู่ภายในเซลล์ แต่พบ peak ของสารที่มี retention time ประมาณ 7 นาที คาดว่าน่าจะเป็นเมตาโบไลท์บางชนิดจากปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน รวมทั้งพบ peak ของสารที่ retention time ประมาณ 18.7 นาที เมื่อเทียบกับ peak ของอะซิเตต (รูปที่ 26B) แล้วเป็นสารเดียวกัน ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดนี้มีปริมาณสูงมาก เมื่อเทียบกับ HPLC โครมาโตแกรมของสารผสมปฏิกิริยา ดังนั้นหลังจากการเกิดปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 4.0 และ 5.5 นาน 72 ชั่วโมงแล้วไม่พบโมโนเมอร์ R3HB เหลืออยู่ภายในเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019 แสดงให้เห็นว่าหลังการเกิดปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019 แล้วโมโนเมอร์ R3HB ที่ผลิตได้ถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ทั้งหมด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A.



B.



รูปที่ 26 HPLC โครมาโตแกรมวิเคราะห์ปริมาณโมโนเมอร์ R3HB ในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ภายหลังการเกิดปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน

A. สารมาตรฐานโมโนเมอร์ R3HB

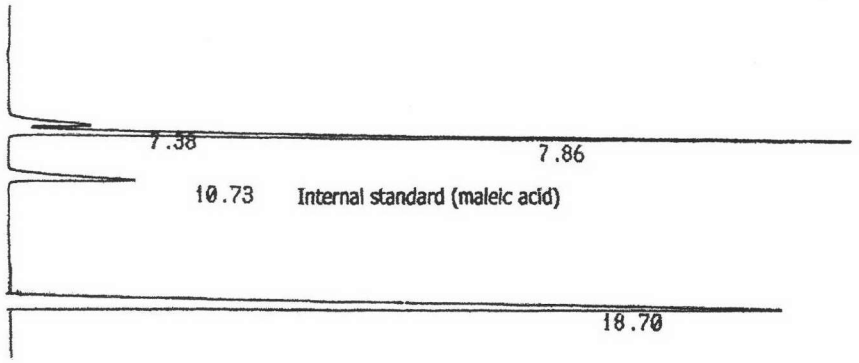
B. อะซิเตต

C. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH เท่ากับ 4.0

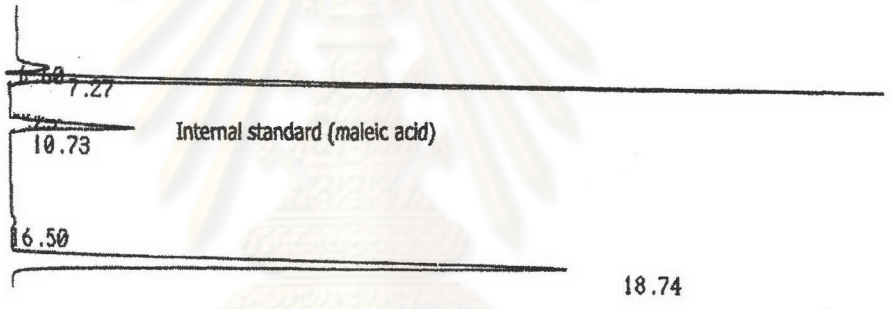
D. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH เท่ากับ 5.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

C.



D.



รูปที่ 26 (ต่อ) HPLC โครมาโตแกรมวิเคราะห์ปริมาณโมโนเมอร์ R3HB ในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ภายหลังการเกิดปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน

A. สารมาตรฐานโมโนเมอร์ R3HB

B. อะซิเตต

C. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH เท่ากับ 4.0

D. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH เท่ากับ 5.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

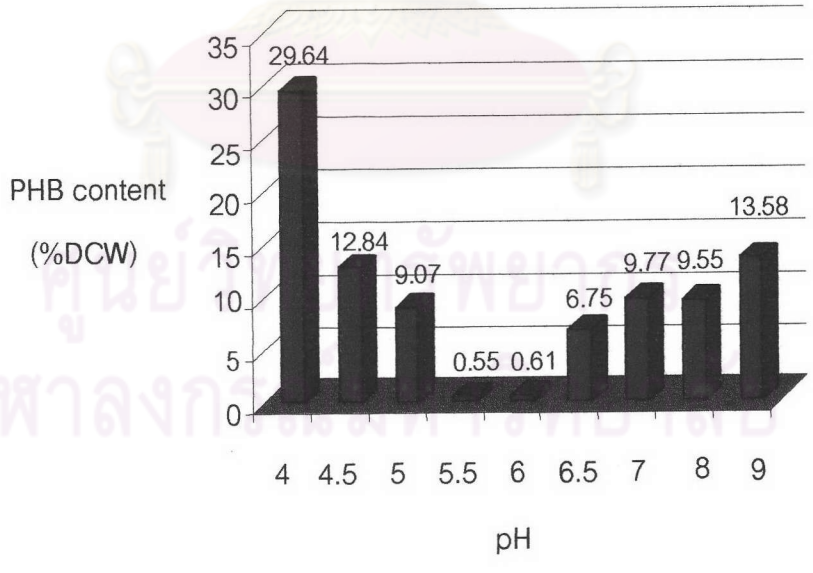
4.6 การตรวจหาปริมาณ PHB ที่เหลืออยู่ภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ภายหลังปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน

ปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันเป็นการย่อยสลาย PHB ให้เป็นโมโนเมอร์ R3HB โดยกิจกรรมของระบบเอนไซม์ intracellular PHB depolymerase เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จึงได้ทำการศึกษาตามวิธีข้อ 3.10 กล่าวคือ นำเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 หลังการทำปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันที่ควบคุมค่า pH เท่ากับ 4.0-9.0, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำวิเคราะห์หาปริมาณ PHB ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 3.14.4 เพื่อตรวจสอบว่ามี PHB เหลืออยู่ภายในเซลล์หรือไม่ ดังแสดงในตารางที่ 11 และรูปที่ 27 พบว่าเซลล์ที่บ่มที่ควบคุมค่า pH เท่ากับ 4.0, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง มีความเข้มข้นของ PHB เหลืออยู่มากที่สุดเท่ากับ 1.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 29.64 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และเซลล์ที่บ่มที่ควบคุมค่า pH เท่ากับ 5.5, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง มีความเข้มข้นของ PHB เหลือน้อยที่สุดเท่ากับ 0.02 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 0.55 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยก่อนหน้านี้ คือ ที่ pH เท่ากับ 4.0 ไม่พบโมโนเมอร์ R3HB ทั้งในสารผสมปฏิกิริยา และในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณ PHB จึงเหลือ PHB มากที่สุด ส่วนที่ pH เท่ากับ 5.5 ซึ่งมีการผลิตโมโนเมอร์ R3HB สูงสุดและปล่อยออกมาละลายอยู่ในสารผสมปฏิกิริยาตรวจพบ PHB ปริมาณน้อยที่สุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ความเข้มข้น และปริมาณของ PHB ภายในเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019 หลังการเกิดปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันควบคุมค่า pH 4.0-9.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ค่า pH ของสารผสมปฏิกิริยา	PHB conc. (g/l)	PHB content (% DCW)
4.0	**1.10**	**29.64**
4.5	0.48	12.84
5.0	0.34	9.07
5.5	0.02	0.55
6.0	0.02	0.61
6.5	0.25	6.75
7.0	0.36	9.77
8.0	0.36	9.55
9.0	0.51	13.58



รูปที่ 27 ปริมาณ PHB ภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ภายหลังปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันที่ควบคุมค่า pH เท่ากับ 4.0-9.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.7 การตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase

ปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ PHB depolymerase วัดกิจกรรมของเอนไซม์จากผลผลิตโมโนเมอร์ R3HB ที่เกิดขึ้นในสารผสมปฏิกิริยา เอนไซม์ R3HB dehydrogenase จะคะตะไลซ์ปฏิกิริยาการเปลี่ยนโมโนเมอร์ R3HB ไปเป็นอะซิโตอะซิเตต การตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์นี้ทำโดยตรวจหาสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้น คือ NADH ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร ดังนั้นเมื่อต้องการให้มีผลผลิตโมโนเมอร์ R3HB สูงสุดในภาวะที่เหมาะสม จำเป็นต้องให้กิจกรรมของเอนไซม์นี้น้อย หรือไม่มีเลย (Lee และคณะ, 1999) ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงเป็นการหาภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase

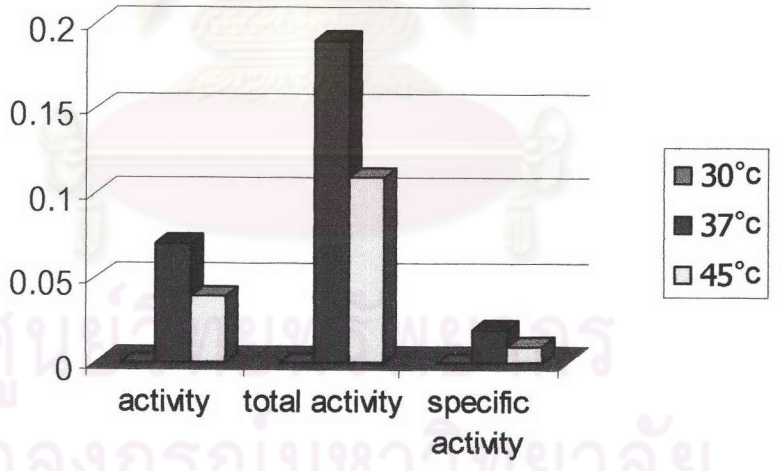
4.7.1 ศึกษาอุณหภูมิของปฏิกิริยาที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase ตามวิธีข้อ 3.11.1 โดยแปรค่าอุณหภูมิของปฏิกิริยาที่ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH เท่ากับ 7.0 ผลการวิจัยแสดงในตารางที่ 12 และรูปที่ 28 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase คือ 37 และ 45 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 0.02 และ 0.01 ตามลำดับ จึงเลือกใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในการทำปฏิกิริยา ในขณะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานผลการวิจัยของ Lee และคณะ (1999) พบว่าเอนไซม์ R3HB dehydrogenase มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเท่ากันกับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ PHB depolymerase สำหรับเชื้อ *Alcaligenes latus* DSM 1123

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase จาก *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างกัน

temp. (°C)	activity ($U.ml^{-1}$)	total activity (U)	specific activity ($U.mg\ of\ protein^{-1}$)
30	-	-	-
37	**0.06**	**0.24**	**0.02**
45	0.03	0.08	0.01



รูปที่ 28 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase จาก *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างกัน

4.7.2 ศึกษาค่า pH ของปฏิกิริยาที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase จาก *Bacillus* sp. BA-019

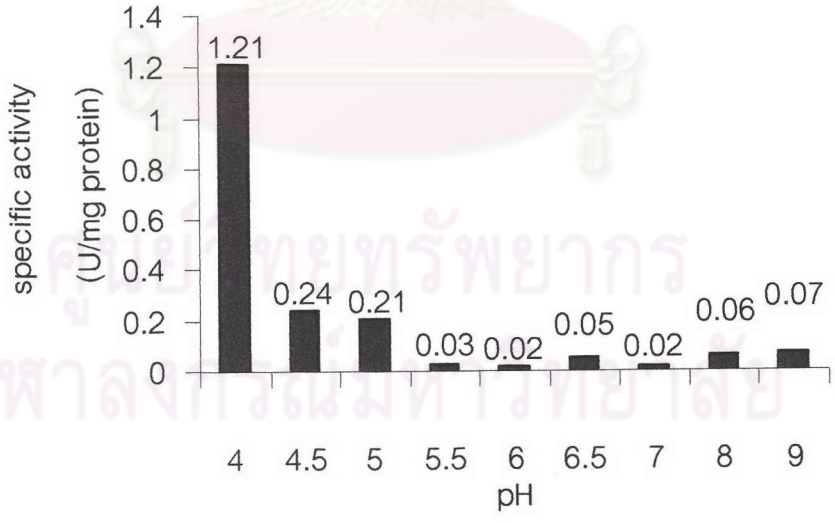
Delafield และคณะ (1965) พบว่าค่า pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ R3HB dehydrogenase จากเชื้อ *Pseudomonas lemoignei* คือที่ pH เท่ากับ 8.0 จากรายงานการวิจัยของ Lee และคณะ (1999) พบว่า เอนไซม์ R3HB dehydrogenase จากเชื้อ *Alcaligenes latus* DSM 1123 มีกิจกรรมสูงสุดที่ค่า pH เท่ากับ 7.0 มีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 15.12 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของค่า pH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase จากเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 เนื่องจากหลังจากปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันของพอลิเมอร์ PHB โดยกิจกรรมของเอนไซม์ PHB depolymerase แล้วได้ผลเป็นโมโนเมอร์ R3HB ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ และสะสมในปริมาณมาก แต่โดยปกติแล้วในเซลล์ของแบคทีเรียที่สะสม PHB หลังจากเกิดปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันได้โมโนเมอร์แล้วโมโนเมอร์นั้นจะกลับเข้าสู่วัฏจักร TCA เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอนของเซลล์ต่อไป ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้โมโนเมอร์ R3HB ที่ผลิตได้ เปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิเตต ค่า pH ขณะทำปฏิกิริยามีความสำคัญต่อกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase เช่นกัน

ในงานวิจัยนี้ศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase ตามวิธีข้อ 3.11.2 บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แปรค่า pH ของปฏิกิริยาด้วยบัฟเฟอร์ในช่วงเท่ากับ 4.0-9.0 ผลการวิจัยแสดงในตารางที่ 13 และรูปที่ 29 พบว่าค่า pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase คือ ที่ pH เท่ากับ 4.0 โดยมีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 1.21 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนในช่วงค่า pH 5.0-6.0 พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำ โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 0.02-0.03

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 กิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase จาก *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อทำปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียส แปรค่า pH ของบัฟเฟอร์เท่ากับ 4.0 - 9.0

buffer	pH	activity ($U.ml^{-1}$)	total activity (U)	specific activity ($U.mg\ of\ protein^{-1}$)
acetate buffer	**4.0**	**3.54**	**9.74**	**1.21**
	4.5	0.69	1.90	0.24
	5.0	0.60	1.65	0.21
	5.5	0.09	0.25	0.03
	6.0	0.04	0.11	0.02
phosphate buffer	6.0	0.04	0.11	0.02
	6.5	0.14	0.39	0.05
	7.0	0.06	0.24	0.02
Tris HCl	8.0	0.17	0.47	0.06
	9.0	0.2	0.55	0.07



รูปที่ 29 เปรียบเทียบ specific activity ของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase เมื่อบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH เท่ากับ 4.0-9.0

4.8 ศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนเมอร์ที่ผลิตได้ด้วยโปรตอน NMR

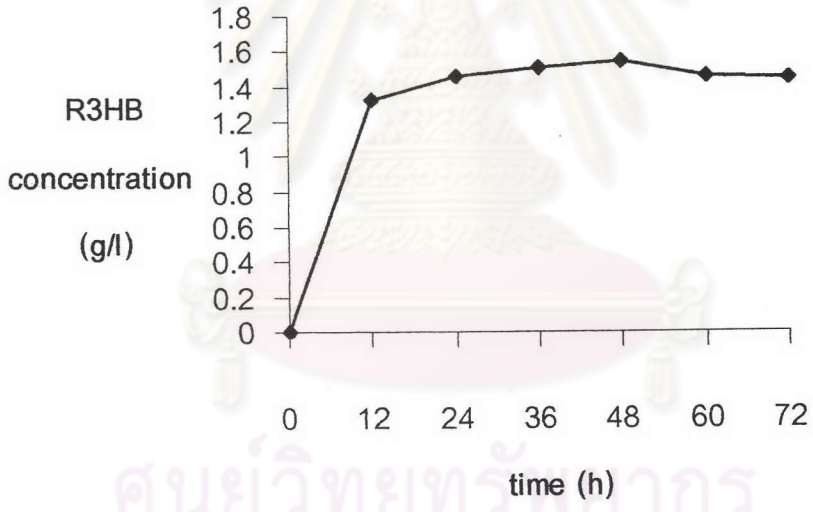
4.8.1 การขยายส่วนการผลิตโมโนเมอร์ R3HB สำหรับทำให้บริสุทธิ์ โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองขนาด 2 ลิตร

จากการศึกษาการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ข้างต้น สารผสมปฏิกิริยาปริมาตร 150 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิตโมโนเมอร์ R3HB ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH เท่ากับ 5.5 มีความเข้มข้นของโมโนเมอร์ R3HB เท่ากับ $1.62 \pm 5.11 \times 10^{-2}$ กรัมต่อลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 94.74 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณ PHB เริ่มต้น เพื่อต้องการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ให้มีปริมาณมากขึ้นจึงทำการทดลองตามวิธีข้อ 3.12.1 โดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ให้มีปริมาตรรวม 1.5 ลิตร นำเซลล์ที่ได้ไปกระจายในน้ำปลอดเชื้อปริมาตร 1.5 ลิตร ในขวดทดลองขนาด 2 ลิตร เพื่อเป็นการขยายส่วนของการผลิตโมโนเมอร์ R3HB บ่มสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH เท่ากับ 5.5 ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโมโนเมอร์ R3HB มากที่สุด เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการวิจัยแสดงในตารางที่ 14 และรูปที่ 30 พบว่าสารผสมปฏิกิริยา 1.5 ลิตรในขวดทดลองขนาด 2 ลิตร เซลล์สามารถผลิตโมโนเมอร์ R3HB มีปริมาณโมโนเมอร์รวม 2.88 กรัมต่อลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 ปริมาณโมโนเมอร์ R3HB ในสารผสมปฏิกิริยาที่บรรจุในขวดทดลองขนาด 2 ลิตร

time (h)	R3HB conc. (g/l)	total R3HB (g)	pH in reaction mixture
0	0	0	5.51
12	1.32	2.64	5.48
24	1.46	2.96	5.40
36	1.51	3.02	5.44
48	1.54	3.08	5.47
60	1.46	2.92	5.43
72	1.44	2.88	5.41



รูปที่ 30 การผลิตโมโนเมอร์ R3HB โดยเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 ในขวดทดลองขนาด 2 ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เนื่องจากการทดลองข้างต้น เป็นการหาภาวะที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019 จากนั้นได้นำผลผลิตโมโนเมอร์ R3HB ในสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH เท่ากับ 5.5 ไปศึกษาโครงสร้างของโมโนเมอร์ R3HB โดยโปรตอน NMR ตามวิธีข้อ 3.12.1 โดยนำสารผสมปฏิกิริยาที่ได้ไปสกัดและระเหิดแห้ง จากนั้นนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยวิธีโปรตอน NMR ผลการวิจัยแสดงในรูปที่ 33 ซึ่งเป็นผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารมาตรฐานโมโนเมอร์ R3HB ด้วยโปรตอน NMR รูปที่ 34 เป็นผลการวิเคราะห์โครงสร้างสารมาตรฐานด้วย ^{13}C NMR และรูปที่ 35 แสดงผลการวิเคราะห์ DEPT-90, 135 ของสารมาตรฐานโมโนเมอร์ R3HB พบว่ามีโครงสร้างเป็น $CH_3CHOHCH_2COOH$ ส่วนในรูปที่ 36 เป็นผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารผสมปฏิกิริยาภายหลังการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโปรตอน NMR พบว่าไม่สามารถหาโครงสร้างได้ เนื่องจากทำการทดลองในระดับขวดทดลอง เมื่อต้องการควบคุมค่า pH ของปฏิกิริยาให้คงที่ตลอดเวลาทำการทดลองเท่ากับ 5.5 จึงต้องควบคุมด้วยโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ ทำให้เมื่อวิเคราะห์สารด้วยวิธี HPLC แล้วพบ peak ซึ่งคาดว่าเป็นอะซิเตตปริมาณมาก และเนื่องจากโมเลกุลของโมโนเมอร์ R3HB คือ กรดบิวไทริก กับกรดอะซิติกมีขนาดใกล้เคียงกัน จึงไม่สามารถหาภาวะเพื่อการวิเคราะห์เฉพาะโมโนเมอร์ R3HB เพียงอย่างเดียวได้ ดังนั้นเพื่อไม่ให้มีโซเดียมอะซิเตตปนอยู่ในสารผสมปฏิกิริยาจึงทำการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ในถังหมัก และควบคุมค่า pH ของปฏิกิริยาโดยใช้กรดไฮโดรคลอริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์

ในงานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตพอลิเมอร์ PHB ตามวิธีข้อ 3.12.2 โดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการวิจัยแสดงในตารางที่ 15 พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.77 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 1.98 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 56.33 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

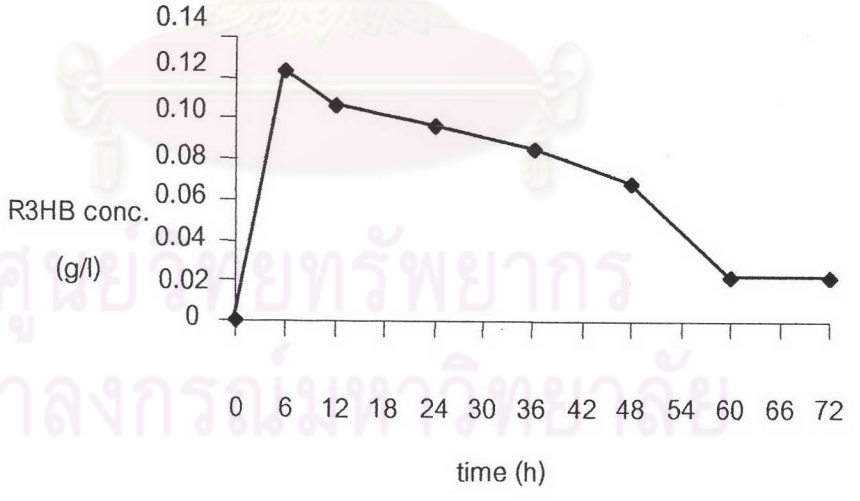
ตารางที่ 15 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ PHB และปริมาณ PHB เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในถังหมักนาน 48 ชั่วโมง

time (h)	DCW (g/l)	PHB conc. (g/l)	PHB content (%DCW)	total sugar (g/l)	urea (g/l)
0	0.1	0	0	17.37	0.46
12	**3.77**	**1.98**	**56.33**	13.06	0.09
18	3.62	1.95	53.85	12.36	0.05
24	3.46	1.44	41.57	12.01	0.04
30	3.45	1.44	41.62	11.42	0
36	3.35	1.13	33.69	9.30	0
42	3.25	1.08	33.13	9.15	0
48	3.13	0.94	30.15	7.30	0

จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปทำปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน ตามวิธีข้อ 3.12.3 บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, ควบคุมค่า pH เท่ากับ 5.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการวิจัยแสดงในตารางที่ 16 และรูปที่ 31 พบว่าเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตโมโนเมอร์ R3HB ได้เพียง 0.08 กรัมต่อลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 3.82 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณ PHB เริ่มต้น และลดลงจนเกือบหมดเมื่อประมาณ 60 ชั่วโมง รูปที่ 32 แสดง HPLC โครมาโตแกรมของสารผสมปฏิกิริยาชั่วโมงที่ 72 พบว่าไม่พบโมโนเมอร์ R3HB แต่พบสารที่มี retention time เท่ากับ 18.7 นาที เมื่อเทียบกับ HPLC โครมาโตรแกรมของอะซิเตตคาดว่าเป็นสารเดียวกัน จากนั้นนำสารผสมปฏิกิริยาหลังจากระเหิดแห้งไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยโปรตอน NMR ดังแสดงในรูปที่ 37 พบว่ายังพบอะซิเตตอยู่ในสารผสมปฏิกิริยา จากรายงานการศึกษาของ Marais และคณะ (1983) พบว่าการใช้พลังงานโดยการย่อยสลายพอลิฟอสเฟตภายใต้สภาวะไม่มีอากาศจะผลิตกรดอะซิติก จากพวกกรดไขมัน เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในวัฏจักร TCA Lee และคณะ (1999) พบว่าเมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 *Alcaligenas latus* DSM 1123 ผลิตโมโนเมอร์ R3HB ได้ปริมาณน้อย และปฏิกิริยาคงที่หลังจากทำปฏิกิริยานาน 3 ชั่วโมง เนื่องจากเกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดขึ้นแต่ไม่ทราบชนิดของกรด

ตารางที่ 16 ความเข้มข้นของโมโนเมอร์ R3HB ที่ได้ เมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยาในถังหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH เท่ากับ 5.5 ด้วยกรดและด่าง อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที

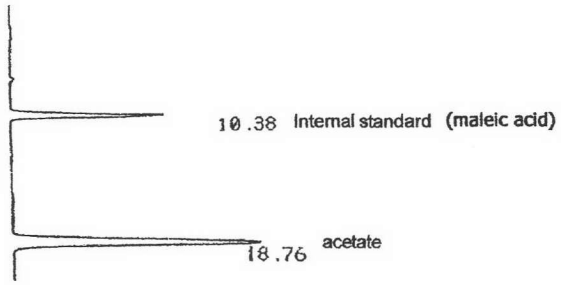
time (h)	R3HB conc. (g/l)	% yield (vs initial PHB)
0	0	0
6	0.12	6.06
12	0.11	5.56
24	0.10	5.05
36	0.09	4.55
48	0.07	3.53
60	0.02	1.11
72	0.02	1.11



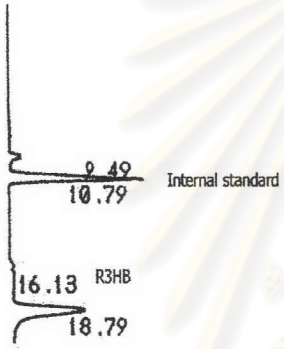
รูปที่ 31 ความเข้มข้นของโมโนเมอร์ R3HB เมื่อบ่มสารผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, ควบคุมค่า pH เท่ากับ 5.5 ด้วยกรดและด่าง ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A.



B.



รูปที่ 32 HPLC โครมาโตรแกรมของสารผสมปฏิกิริยาภายในถังหมัก

A. โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

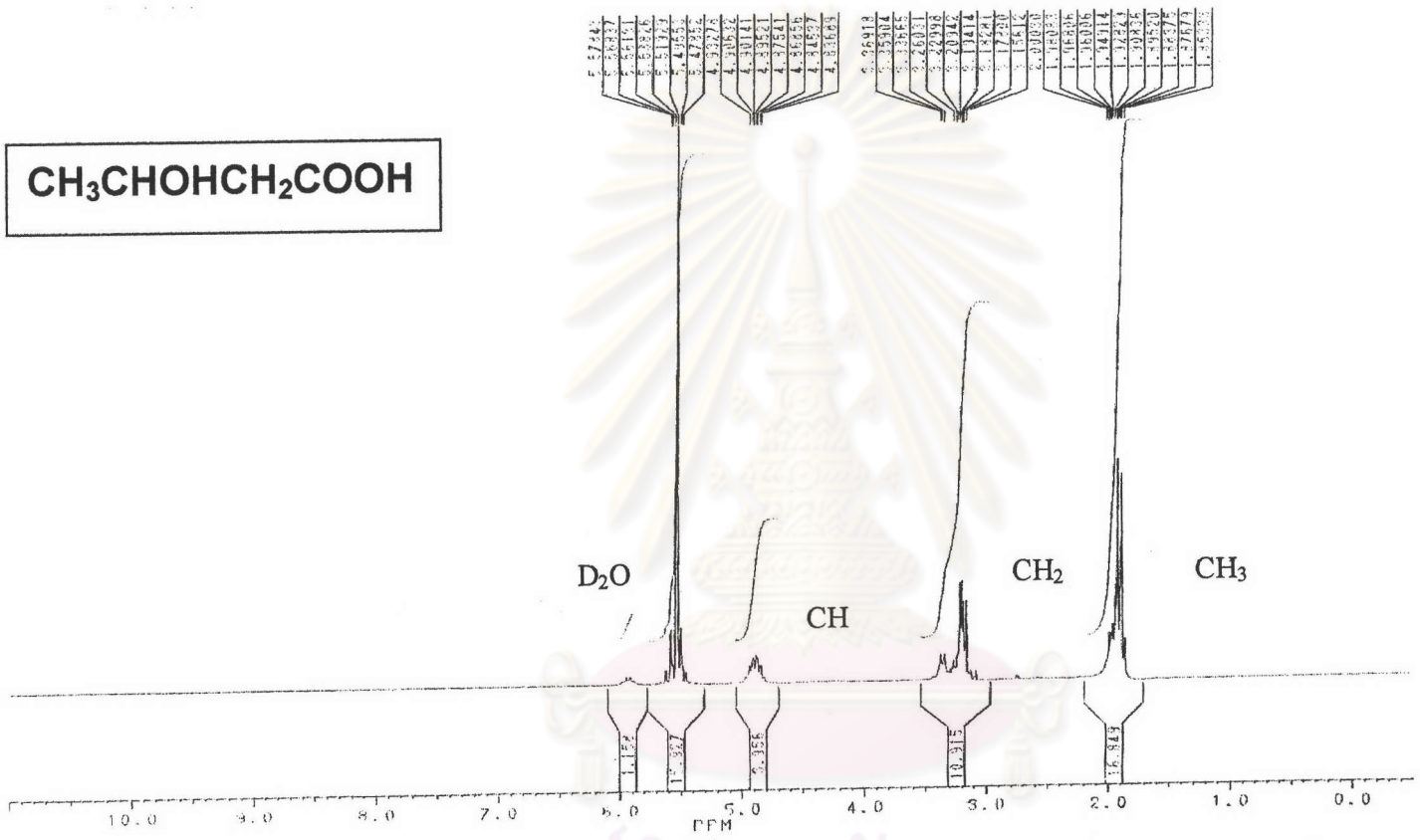
B. สารผสมปฏิกิริยาในถังหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH เท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรูปที่ 32A แสดง HPLC โครมาโตแกรมของอะซิเตต พบว่ามี retention time เท่ากับ 18.39 นาที ในรูปที่ 32B ซึ่งเป็น HPLC โครมาโตแกรมของสารผสมปฏิกิริยาในถังหมัก พบว่ามีสารที่มี retention time ตรงกับ HPLC โครมาโตแกรมของอะซิเตต จึงคาดว่าน่าจะมีอะซิเตตเกิดขึ้นในสารผสมปฏิกิริยาอีก ทั้งที่ไม่ได้ใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์แล้ว และเมื่อพิจารณาการทดลองปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันที่ผ่านมาตั้งแต่ต้น พบว่าในสารผสมปฏิกิริยาจะมีสารที่ retention time นี้ทุกชุดการทดลอง ดังนั้นคาดว่ากรดอะซิติก หรืออยู่ในรูปเกลืออะซิเตต น่าจะเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน

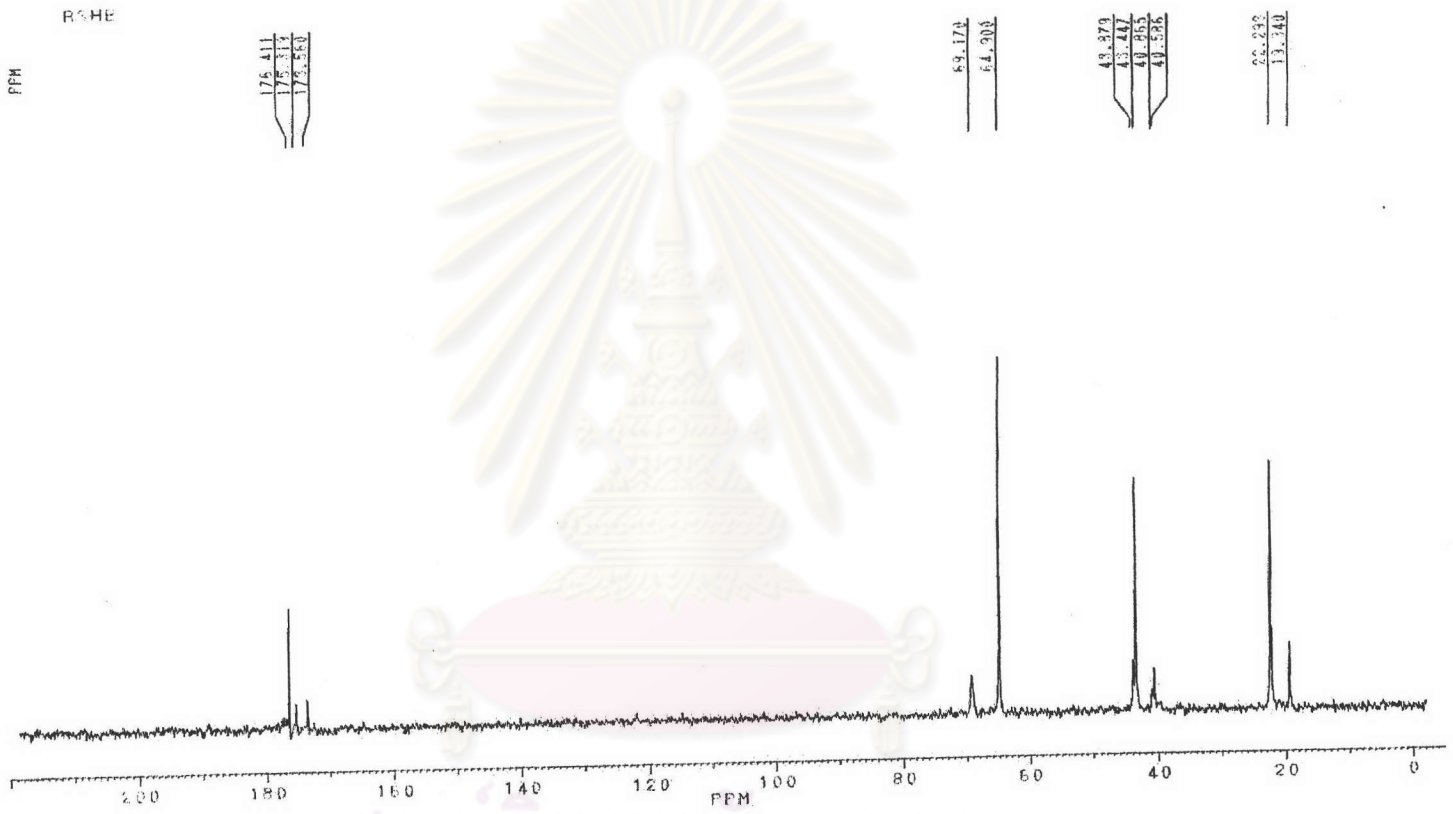
ภาวะในถังหมักในการศึกษานี้อาจเป็นภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน เนื่องจากพบกรดอะซิติกปริมาณมาก ซึ่งจากรายงานของ Gao และคณะ (2002) พบว่ากรดอะซิติกเป็นเมตาโบไลท์ของการผลิตโมโนเมอร์ R3HB สามารถเปลี่ยนจากสารตั้งต้น คือ อะซิติลโคเอไปเป็นกรดอะซิติก ทำให้ปริมาณอะซิติลโคเอที่จะเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ PHB น้อยลง ทำให้ได้ปริมาณโมโนเมอร์ R3HB น้อยลง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



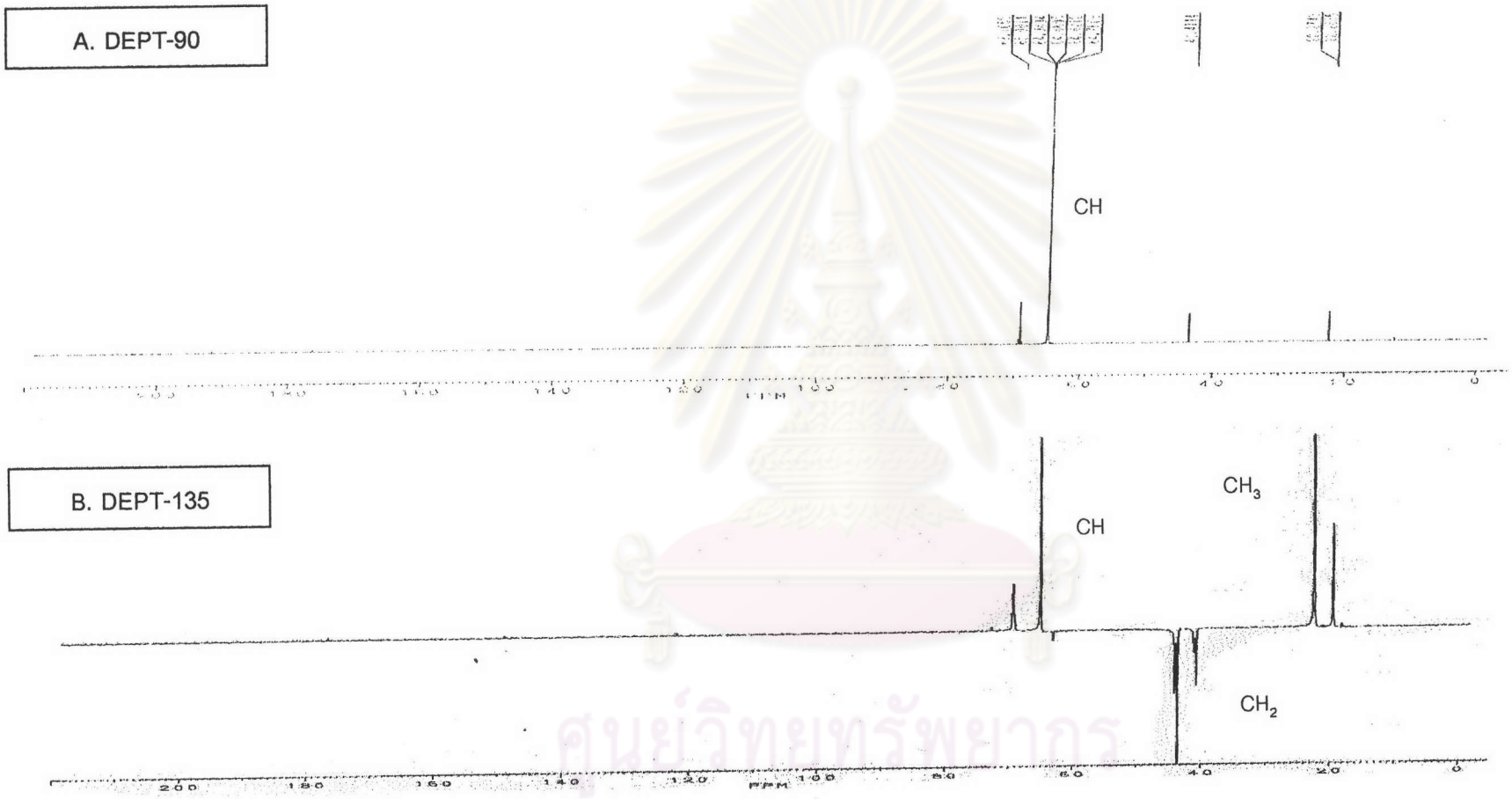
รูปที่ 33 ผลการวิเคราะห์ด้วยโปรตอน NMR ของสารมาตรฐานกรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวไทริก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



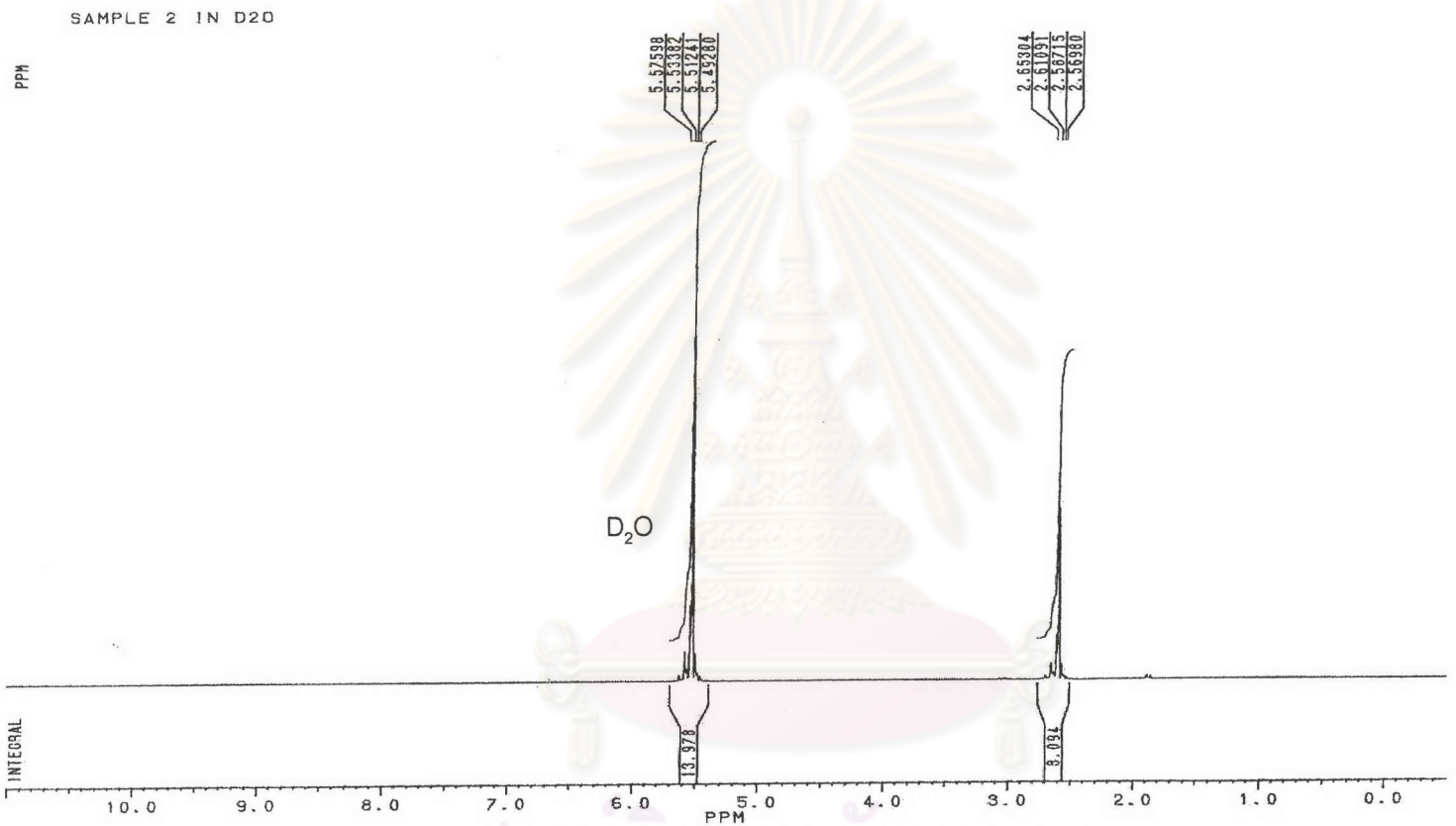
รูปที่ 34 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยคาร์บอน NMR ของสารมาตรฐานกรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวไทริก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



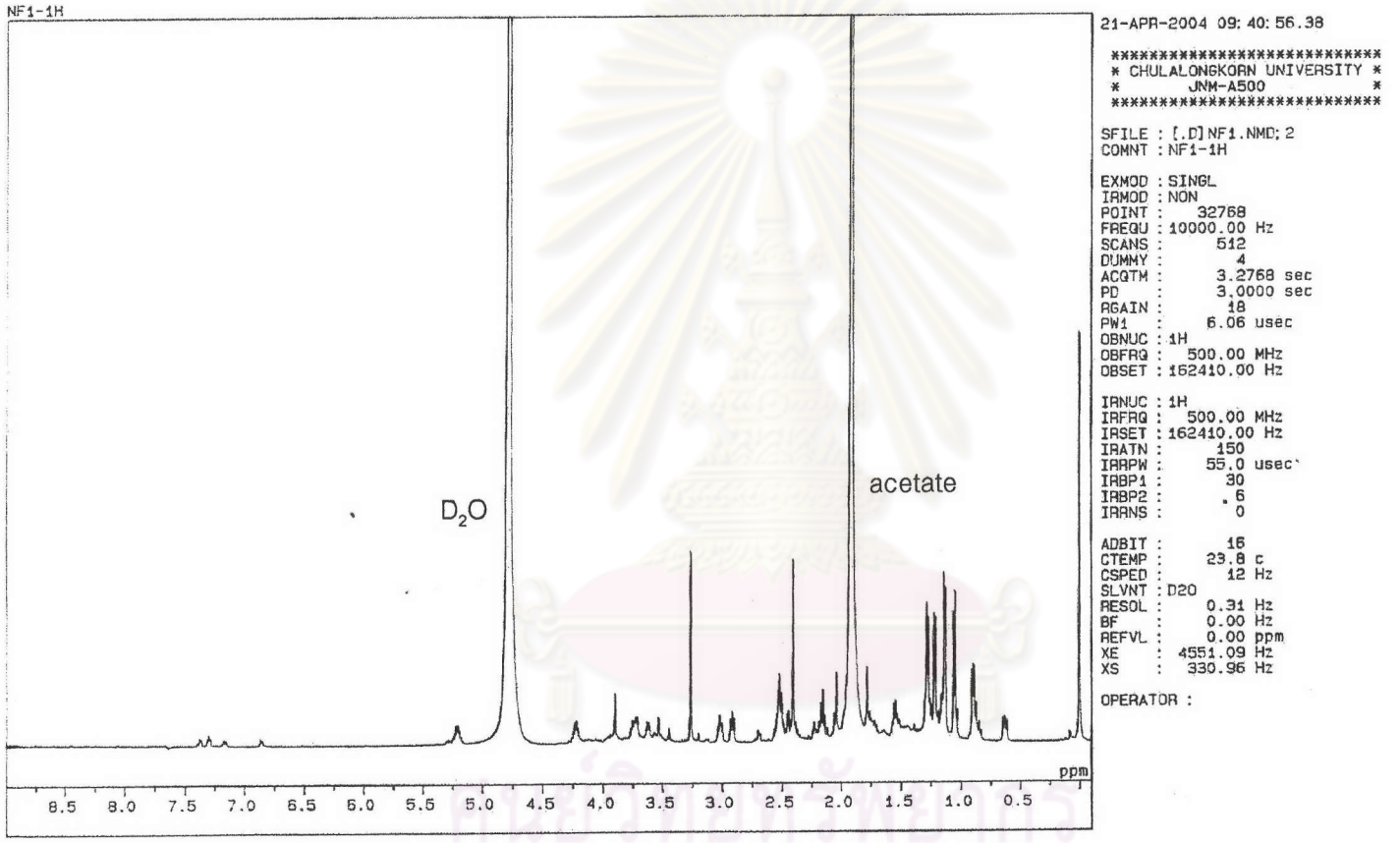
รูปที่ 35 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยคาร์บอน NMR A.) DEPT-90 B.) DEPT-135 ของสารมาตรฐานกรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวไทริก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 36 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยโปรตอน NMR ของสารผสมปฏิกิริยาในขวดทดลองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, ควบคุมค่า pH เท่ากับ 5.5 ด้วยโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 37 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยโปรตอน NMR ของสารผสมปฏิกิริยาในถังหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, ควบคุมค่า pH เท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.11 การจัดจำแนกสปีชีส์ของ *Bacillus* sp. BA-019

รัตนศิริ มุทิตากุล ได้แยกและคัดกรองเชื้อแบคทีเรียจากดินในปี 2538 และจากผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยาร่วมกับผลทดสอบทางชีวเคมี พบว่าจำแนกจีนัสของแบคทีเรียชนิดนี้ว่าเป็นแบคทีเรียจีนัส Bacillus เพื่อจำแนกสปีชีส์ของเชื้อดังกล่าวจึงทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์16S ribosomal DNA ของ *Bacillus* sp. BA-019 ที่หน่วยบริการชีวภาพ (BIOSERVICE UNIT, BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

ในงานวิจัยนี้หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ตามวิธีข้อ 3.13 ผลการวิจัยแสดงในรูปที่ 38 พบว่าเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ไปเปรียบเทียบกับ GenBank สามารถจัดจำแนก *Bacillus* sp. BA-019 เป็น *Bacillus megaterium* ซึ่งมีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ complete 16S rDNA ของ *Bacillus megaterium* ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```
          10         20         30         40         50
5' AGGCGTGCCT AATACATGCA ACGTCGAGCG AACTGATTAG AAGCTTGCTT
          60         70         80         90        100
   CTATGACGTT AGCGGCGGAC GGGTGAGTAA CACGTGGGCA ACCTGCCTGN
         110        120        130        140        150
   TAAGACTGGG ATAACTTCGG GAAACCGAAG CTAATACCGG ATAGGATCTT
         160        170        180        190        200
   CTCCTTCATG GGAGATGATT GAAAGATGGT TTCGGCTATC ACTTACAGAT
         210        220        230        240        250
   GGGCCCGCGG TGCATTAGCT AGTTGGTGAG GTAACGGCTC ACCAAGGCAA
         260        270        280        290        300
   CGATGCATAG CCGACCTGAG AGGGTGATCG GCCACACTGG GACTGAGACA
         310        320        330        340        350
   CGGCCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTA GGGAATCTTC CGCAATGGAC
         360        370        380        390        400
   GAAAGTCTGA CGGAGCAACG CCGCGTGAGT GATGAAGGCT TTCGGGTCGT
         410        420        430        440        450
   AAAACTCTGT TGTTAGGGAA GAACAAGTAC GAGAGTAACT GCTCGTACCT
         460        470        480        490        500
   TGTACGGTAC CTAACCAGAA AGCCACGGCT AACTACGTGC CAGCAGCCGC
         510        520        530        540        550
   GGNTAATACG TAGGTGGCAA GCGTTATCCG GAATTATTGG GCGTAAAGCG
         560        570        580        590        600
   CGCGCAGGCG GTTTCTTAAG TCTGATGTGA AAGCCCACGG CTCAACCGTG
         610        620        630        640        650
   GAGGGTCATT GGAAACTGGG GAACTTGAGT GCAGAAGAGA AAAGCGGAAT
         660        670        680        690        700
   TCCACGTGTA GCGGTGAAAT GCGTAGAGAT GTGGAGGAAC ACCAGTGGCG
         710        720        730        740        750
   AAGGCGGCTT TTTGGTCTGT AACTGACGCT GAGGCGCGAA AGCGTGGGGA
         760        770        780        790        800
   GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCCGTAAAC GATGAGTGCT
         810        820        830        840        850
   AAGTGTTAGA GGGTTTCCGC CCTTTAGTGC TGCAGCTAAC GCATTAAGCA
         860        870        880        890        900
   CTCCGCCTGG GGAGTACGGT CGCAAGACTG AAACTCAAAG GAATTGACGG
         910        920        930        940        950
   GGGCCCGCAC AAGCGGTGGA GCATGTGGTT TAATTCGAAG CAACGCGAAG
         960        970        980        990       1000
   AACCTTACCA GGTCTTGACA TCCTCTGACA ACTCTAGAGA TAGAGCGTTC
        1010       1020       1030       1040       1050
   CCCTTCGGGG GACAGAGTGA CAGGTGGTGC ATGGTTGTCG TCAGCTCGTG
        1060       1070       1080       1090       1100
   TCGTGAGATG TTGGGTTAAG TCCCGCAACG AGCGCAACCC TTGATCTTAG
        1110       1120       1130       1140       1150
   TTGCCAGCAT TTAGTTGGGC ACTCTAAGGT GACTGCCGGT GACAAACCGG
        1160       1170       1180       1190       1200
   AGGAAGGTGG GGATGACGTC AAATCATCAT GCCCCTTATG ACCTGGGCTA
        1210       1220       1230       1240       1250
   CACACGTGCT ACAATGGATG GTACAAAGGG CTGCAAGACC GCGAGGTCAA
        1260       1270       1280       1290       1300
   GCCAATCCCA TAAAACCATT CTCAGTTCGG ATTGTAGGCT GCAACTCGCC
        1310       1320       1330       1340       1350
   TACATGAAGC TGGAATCGCT AGTAATCGCG GATCAGCATG CCGCGGTGAA
        1360       1370       1380       1390       1400
   TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCANC GAGAGTTTGT
        1410       1420       1430       1440       1450
   AACACCCGAA GTCGGTGGAG TAACCGTAAG GAGCTAGCCG CCTAAGGTGG
        1460       1470
   GACAGATGAA TTGGGGTGAA GTCGTAA 3'
```

รูปที่ 38 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019